

**ANALISIS *IN SILICO* PRIMER MULTIPLEX GEN *HOUSEKEEPING* PADA IKAN
SIDAT (*Anguilla bicolor*)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai syarat untuk memenuhi sebagian syarat memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi Departemen Pendidikan Biologi



oleh

Yusi Yustami

NIM 1604377

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA
2020**

Yusi Yustami, 2021

ANALISIS IN SILICO PRIMER MULTIPLEX GEN HOUSEKEEPING PADA IKAN SIDAT (Anguilla bicolor)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

**ANALISIS *IN SILICO* PRIMER MULTIPLEX GEN *HOUSEKEEPING* PADA
IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor*)**

Oleh

Yusi Yustami

Sebuah Skripsi yang diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana
Sains Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam

©Yusi Yustami

Universitas Pendidikan Indonesia

2020

Hak cipta dilindungi undang-undang

Skripsi ini tidak boleh diperbanyak seluruhnya atau sebagian

Dengan dicetak ulang, difotokopi, atau cara lainnya tanpa ijin dari penulis

YUSI YUSTAMI

**ANALISIS IN SILICO PRIMER MULTIPLEX GEN HOUSEKEEPING
PADA IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor*)**

Disetujui dan disahkan oleh pembimbing:

Pembimbing I



Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.
NIP. 197008112001122001

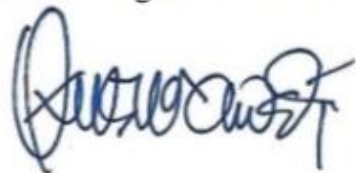
Pembimbing II



Any Aryani, M.Si.
NIP. 197105302001122001

Mengetahui

Ketua Program Studi Biologi



Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.
NIP. 197008112001122001

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “**ANALISIS *IN SILICO* PRIMER MULTIPLEX GEN *HOUSEKEEPING* PADA IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor*)**” beserta seluruh isinya adalah benar-benar karya saya sendiri, dan saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan dengan cara yang tidak sesuai dengan aturan etika ilmu yang berlaku dalam masyarakat keilmuan. Atas pernyataan ini, saya siap menanggung resiko atau sanksi apabila di kemudian hari ditemukan adanya pelanggaran etika keilmuan atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya ini.

Bandung, November 2020

Yusi Yustami
NIM. 1604377

KATA PENGANTAR

Puji serta syukur senantiasa penulis panjatkan kehadiran Allah SWT., karena atas berkah rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“ANALISIS *IN SILICO* PRIMER MULTIPLEX GEN *HOUSEKEEPING* PADA IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor*)”** yang diajukan sebagai salah satu syarat dan tugas akhir memperoleh gelar Sarjana Sains di Program Studi Biologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Penulis menyadari bahwa skripsi yang dibuat ini masih terdapat banyak kekurangannya, hal ini dikarenakan keterbatasan pengetahuan yang penulis miliki. Penulis memohon maaf atas segala kesalahan dan kekurangan yang terdapat dalam skripsi ini, kritik serta saran sangat penulis harapkan untuk perbaikan di masa yang akan datang.

Pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini penulis tidak terlepas dari bimbingan, bantuan dan motivasi dari berbagai pihak, oleh sebab itu oleh karena itu selayaknya bagi penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si., selaku dosen pembimbing I sekaligus ketua Program Studi Biologi yang telah membimbing, memberi masukan, serta motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi ini selesai.
2. Ibu Any Aryani, M.Si., selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing, memberi masukan, serta motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi ini selesai.
3. Ibu Dr. Hj. Any Fitriani, M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, masukan, serta motivasi kepada penulis selama awal perkuliahan hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini.
4. Bapak Dr. Bambang Supriatno, M.Si., selaku Ketua Departemen Pendidikan Biologi yang telah memberikan kemudahan kepada penulis selama proses perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini.
5. Segenap dosen Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI atas segala ilmu, bimbingan, nasihat, serta fasilitas bagi penulis dalam menempuh pendidikan di

bidang MIPA, terutama Biologi selama masa perkuliahan hingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.

6. Seluruh staff akademik beserta laboran Laboratorium Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI yang selalu membantu dalam memberikan fasilitas, bimbingan, dan berbagai kemudahan pada penulis sehingga dapat menunjang penulis dalam pembuatan skripsi ini.
7. Kedua orang tua yang selalu mendukung, memberi bantuan secara materil dan mendoakan untuk keberhasilan penulis. Lalu kepada saudara kembar saya Yasi Yastami yang selalu ada memberi dukungan dan semangat hingga penyusunan skripsi ini selesai.
8. Kakak senior Tina Yulianti, Siti Nur Endah dan Sylviani Aulia Rahma atas bantuan, bimbingan, dan semangat yang diberikan kepada penulis hingga penyusunan skripsi ini selesai.
9. Teman-teman Biologi C 2016 yang telah berjuang bersama selama 4 tahun perkuliahan, terutama sahabat seperjuangan peneliti yaitu Annisa Martina Firdausa, Fitri Widiyanti, Siti Triani Rakhmirianti, dan Stella Melbournita Noor Augustine.
10. Sahabat-sahabat saya Bilqis, Dina, Dini, Iqlima, dan Zahra yang selalu memberi dukungan, motivasi dan semangat pada penulis.
11. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Berkat bantuan dan doa dari orang-orang akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga Allah SWT senantiasa membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis maupun pihak lain.

Bandung, November 2020

Penulis

Yusi Yustami

**ANALISIS *IN SILICO* PRIMER MULTIPLEX GEN HOUSEKEEPING
PADA IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor*)**

ABSTRAK

Indonesia merupakan salah satu negara sebagai pengeksport ikan sidat (*Anguilla bicolor*), produk dihasilkan melalui budidaya benih (*glass eel*) yang ditangkap di muara sungai. Budidaya pemijahan ikan sidat sulit dilakukan, dapat disebabkan kondisi lingkungan yang mengganggu sistem metabolisme tubuh ikan. Berdasarkan hal tersebut tujuan penelitian ini adalah memonitoring kelulushidupan ikan sidat dengan cara memonitoring ekspresi gen-gen stres dengan merancang primer *multiplex Real Time-PCR* pada gen *housekeeping* 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *Beta Actin* (β aktin) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α), guna analisis ekspresi gen yang diuji pada organ hati, ginjal, dan usus ikan sidat. Isolasi RNA dilakukan pada ikan sidat menggunakan organ hati, ginjal dan usus. Sekuen spesifik ketiga gen *housekeeping* dirancang untuk RT-PCR pada laman primer3. Primer *multiplex* dianalisis menggunakan *software FastPCR* untuk mengamplifikasi gen *housekeeping* secara *in silico*. Studi pustaka seleksi gen *housekeeping* dilakukan dengan 3 gen kandidat *housekeeping* yaitu 18S rRNA, β aktin, dan EF1 α untuk mendapatkan gen yang terekspresikan secara stabil. Hasil analisis primer *multiplex* secara *in silico* menunjukkan ketiga primer teramplifikasi dan menghasilkan ampikon berukuran <150 bp pada primer 18S rRNA & EF1 α , dan 500 bp pada primer β aktin. Nilai deltaG berkisar antara 0 dan -2 kkal/mol. Nilai PCR *efficiency* ketiga primer >70 %. Studi pustaka seleksi gen *housekeeping* yang berpotensi memiliki stabilitas tinggi adalah gen 18S rRNA. Berdasarkan uji primer *multiplex* secara *in silico* ketiga gen dapat digunakan dalam analisis RT-PCR secara *in vitro* penelitian selanjutnya.

Kata Kunci : *Anguilla bicolor*, Gen *Housekeeping*, Primer *Multiplex*, *Real Time-PCR*.

ANALYSIS IN SILICO PRIMER MULTIPLEX OF GENE HOUSEKEEPING PRIMARY IN EEL FISH (*Anguilla bicolor*)

ABSTRACT

*Indonesia is one of the countries as an exporter of eel (*Anguilla bicolor*), the product is produced through the cultivation of seeds (glass eel) caught in river estuaries. Eel spawning is difficult to do, it can be caused by environmental conditions that interfere with the fish's metabolic system. Based on this, the purpose of this study was to monitor the survival of the eels by monitoring the expression of stress genes by designing primers. multiplex Real Time-PCR on genes housekeeping 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), β Actin (β actin) and Elongation Factor 1-Alpha (EF1 α), for analysis of gene expression tested in liver, kidney and intestines of eel. RNA isolation was carried out on eel using the liver, kidneys and intestines. The specific sequences of the three genes were housekeeping designed for RT-PCR on the primary page³. Primary multiplex analyzed using FastPCRsoftware to amplify genes housekeeping in silico. A literature study on gene selection was housekeeping carried out with 3 candidate genes, housekeeping namely 18S rRNA, β actin, and EF1 α to obtain genes that were expressed stably. The results of primer analysis multiplex by in silico showed that the three primers were amplified and produced amplicons of <150 bp in size 18S rRNA & EF1 α primers, and 500 bp on β actin primers. The deltaG values range between 0 and -2 kcal / mol. The PCR efficiency value of the three primers is > 70%. The literature study on housekeeping gene selection that has the potential for high stability is the 18S rRNA gene. Based on the multiplex primer test, the in silico three genes can be used in RT-PCR analysis in vitro in future studies.*

Keywords : *Anguilla bicolor, Housekeeping Gene, Multiplex Primer, Real Time-PCR.*

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Pertanyaan Penelitian.....	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Tujuan	4
1.6 Manfaat	4
1.7 Struktur Organisasi	5
BAB II IKAN SIDAT (<i>Anguilla bicolor</i>), GEN REFERENSI, REAL TIME PCR, MULTIPLEX PCR, ANALISIS ASAM NUKLEAT SECARA KUANTITATIF DAN KUALITATIF	6
2.1 Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>)	6
2.1.1 Klasifikasi Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>).....	6
2.1.2 Morfologi Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>).....	6
2.1.3 Anatomi Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>)	7
2.1.4 Habitat dan Penyebaran Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>).....	9
2.1.5 Kandungan Nutrisi Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>)	10
2.2 Gen referensi.....	12
2.3 18S Ribosomal RNA (18S rRNA)	12
2.4 <i>beta Actin</i> (β aktin).....	13
2.5 <i>Elongation Factor 1-Alpha</i> (EF1 α).....	13
2.6 <i>Real Time Polymerase chain reaction</i> (RT-PCR).....	13
2.7 Primer <i>Multiplex</i>	19
2.8 Analisis Asam Nukleat secara Kuantitatif dan Kualitatif	20
2. 8. 1 Analisis Kuantitatif	20
2. 8. 2 Analisis Kualitatif	20

BAB III METODE PENELITIAN	22
3.1 Desain Penelitian	22
3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian	22
3.3 Alat dan Bahan.....	22
3.4 Prosedur Penelitian	22
3.4.1 Desain Primer	22
3.4.2 Pengujian Primer <i>Multiplex</i> Secara <i>In Silico</i>	24
3.4.3 Isolasi mRNA Total Dari Organ.....	25
3.4.4 Uji Kualitatif dan Kuantitatif mRNA Total	26
3.4.5 Sintesis cDNA.....	27
3.4.6 Optimasi Primer <i>Multiplex</i>	27
3.4.7 <i>Real Time</i> PCR.....	28
3.5 Analisis Data.....	29
3.5.1 Analisis <i>In Silico</i> Primer <i>Multiplex</i>	29
3.5.2 Studi Pustaka Seleksi Gen <i>Housekeeping</i> dengan Metode <i>Real Time</i> PCR.....	29
3.6 Alur Penelitian	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1 Hasil Isolasi RNA	31
4.2 Primer Gen <i>Housekeeping</i> Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>) Hasil Rancangan	33
4.3 Analisis <i>In Silico</i> Primer <i>Multiplex Housekeeping Gene</i> Ikan Sidat (<i>Anguilla bicolor</i>).....	42
4.4 Seleksi Gen <i>Housekeeping</i> Dengan Metode <i>Real Time</i> PCR.....	46
BAB V SIMPULAN, IMPLIKASI, DAN REKOMENDASI	50
5.1 Simpulan	50
5.2 Implikasi	50
5.3 Rekomendasi.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN 1.....	59
LAMPIRAN 2.....	62
LAMPIRAN 3.....	63
LAMPIRAN 3.....	65
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	66

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Kandungan Nutrisi Ikan Sidat Dan Ikan Salmon	11
4.1. Nilai Kemurnian dan Konsentrasi Isolasi mRNA ikan sidat (<i>Anguilla bicolor</i>) menggunakan UV Spektrofotometer dengan pengenceran 100x.....	32
4.2. Hasil rancangan primer spesifik gen <i>housekeeping</i> ikan sidat (<i>Anguilla bicolor</i>) pada laman primer3.....	36
4.3. Nilai persentase GC, Tm, <i>self complementarity</i> dan nilai <i>self 3' complementarity</i> primer spesifik gen <i>housekeeping</i> ikan sidat (<i>Anguilla bicolor</i>) pada laman primer3.....	37
4.4. Hasil analisis struktur sekunder primer spesifik gen <i>housekeeping</i> ikan sidat (<i>Anguilla bicolor</i>) berdasarkan Beacon Designer	38
4.5. Hasil uji homologi BLAST gen 18SrRNA pada laman Primer BLAST NCBI.	40
4.6. Hasil uji homologi BLAST gen β aktin pada laman Primer BLAST NCBI... ..	41
4.7. Hasil uji homologi BLAST gen EF1 α pada laman Primer BLAST NCBI.... ..	41
4.8. Hasil analisis primer <i>multiplex</i> secara <i>in silico</i> pada aplikasi <i>FastPCR</i>	43
4.9. Nilai stabilitas RT-PCR Kandidat Gen Referensi.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Ikan sidat (<i>Anguilla bicolor</i>)	6
2.2. Morfologi ikan sidat	7
2.3. Struktur morfologi saluran pencernaan ikan sidat	8
2.4. Struktur morfologi sistem Urogenital ikan sidat betina	8
2.5. Peta distribusi ikan sidat (<i>Anguilla bicolor</i>) di perairan dunia	10
2.6. Proses Real Time PCR menggunakan pewarna SBYR <i>Green</i>	14
2.7. Proses Real Time PCR menggunakan <i>Probe TaqMan</i>	16
2.8. Kurva <i>Real Time PCR</i>	18
2.9. Proses desain primer <i>multiplex</i>	20
2.10. Elektroforegram hasil isolasi mRNA yang menunjukkan pita 18S dan 28S 21	
3.1. Bagan Alur Penelitian	30
4.1. Elektroforegram hasil isolasi mRNA total organ usus, hati, ginjal ikan sidat pada gel agarose 1% dengan formamide dalam buffer TAE 2X, 50 V, 30 menit.....	31
4.2. Sekuen spesifik 18SrRNA <i>Anguilla bicolor</i>	34
4.3. Sekuen spesifik β aktin <i>Anguilla bicolor</i>	35
4.4. Sekuen spesifik EF1A <i>Anguilla bicolor</i>	35
4.5. Hasil uji homologi BLAST sekuen 18S Ribosomal RNA (18S rRNA) dengan spesies <i>Anguilla bengalensis</i> pada laman NCBI.....	44
4.6. Hasil uji homologi BLAST sekuen Beta aktin (β aktin) dengan spesies <i>Anguilla japonica</i> pada laman NCBI.....	45
4.7. Hasil uji homologi BLAST sekuen <i>Elongation Factor 1-Alpha</i> (EF1 α) dengan spesies <i>Anguilla anguilla</i> pada laman NCBI.	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan bahan penelitian	59
Lampiran 2. Protokol Pembuatan Larutan Stok	62
Lampiran 3. Keterangan Sekuen pada Penelitian yang Diperoleh pada Laman NCBI.....	63
Lampiran 4. Perancangan Primer Pada Laman Primer3 & Analisis <i>In Silico</i> Pada <i>Software FastPCR</i>	63

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi, R. (2005). Strategi Pemanfaatan Sumberdaya Ikan Sidat *Anguilla* sp. di Indonesia. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 5(2), 77-81. doi: <https://doi.org/10.32491/jii.v5i2.242>.
- Aithal, M. G. S., & Rajeswari, N.. (2015). Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Glioblastoma Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Brain Tumor Res Treat*, 3(1), 24-29. doi: [10.14791/btrt.2015.3.1.24](https://doi.org/10.14791/btrt.2015.3.1.24).
- Applied Biosystems*. (2004). Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
- Applied Biosystems*. (2010). Factors Influencing Multiplex Real-Time PCR. APPLICATION NOTE Multiplex Real-Time PCR.
- Armijn, A.. (2020). *Pembentukan Sistem Urogenital Mamalia*. (Skripsi). Program Studi Biologi, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Bakri, Z., Hatta, M., & Massi, M.N. (2015). Deteksi Keberadaan Bakteri Escherichia Coli O157:H7 pada Feses Penderita Diare dengan Metode Kultur dan PCR. *JST Kesehatan*, 5(2), 184 – 192.
- Baskoro, M.S., Purbayanto, A., Haluan, J., Nuitja, I.N.S., Affandi, R., Sumantadinata, ... Jaya, I. (2016). *Pengembangan Teknologi Perikanan dan Kelautan untuk Memperkuat Ketahanan Pangan serta Memacu Perekonomian Nasional secara Berkelanjutan*. Bogor: IPB Press.
- Baxevanis, A.D., Bader, G.D., & Wishart, D.S.. (2020). *Bioinformatics, 4th Edition* (Chapter 3, hlm 45-78). Hoboken : John Wiley & Sons, Inc.
- Brown, S.S., Chen, Y.W., Wang, M., Clipson, A., Ochoa, E., & Du, M.Q.. (2017). Primerpooler: Automated Primer Pooling To Prepare Library For Targeted Sequencing. *Biology Methods And Protocols*, 2(1), 1–10. doi: [10.1093/Biomethods/Bpx006](https://doi.org/10.1093/Biomethods/Bpx006).
- Caracausi, M. , Piovesan, A. , Antonaros, F. , Strippoli, P. , Vitale, L., & Pelleri, C.M.. (2017). Systematic Identification of Human Housekeeping Genes Possibly Useful As References in Gene Expression Studies. *Molecular Medicine Reports*, 16(3), 2397-2410. doi: [10.3892/mmr.2017.6944](https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6944).
- Cholifah, D., Febriani, M., Ekawati, A.W., & Risjani, Y.. (2012)._Pengaruh Penggunaan Tepung Silase Daun Mengkudu (*Morinda Citrifolia*) dalam Formula Pakan Terhadap Pertumbuhan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*) Stadia Elver. *Jurnal Kelautan*, 5(2), 93-107. doi: [https://Doi.Org/10.21107/Jk.V5i2.864](https://doi.org/10.21107/Jk.V5i2.864).
- Denisov, V., Strong, W., Walder, M., Gingrich, J., & Wintz, H.. (2008). Development and Validation of RQI: an RNA Quality Indicator For The Experion Automated Electrophoresis System, *Bio-Rad Bulletin* #5761.

- Desain Premier Biosoft. (2020). *PCR Primer Design Guidelines*. [Online]. Diakses dari: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html..
- Direktorat Jenderal Perikanan Tangkap. (2015). *Statistik Perikanan Tangkap Indonesia Tahun 2014*. Jakarta (ID). International Standard Serial Number : 1858-0505.
- Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J., & Klapper, P.E.. (2000). Multiplex Pcr: Optimization And Application In Diagnostic Virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13(4), 559. doi : 10.1128/Cmr.13.4.559-570.2000.
- Elsberger, B., Fullerton, R., Zino, S., Jordan, F., Mitchell, T.J., Brunton, V.G., ... Edwards, J..(2010). Breast Cancer Patients' Clinical Outcome Measures Are Associated With Src Kinase Family Member Expression.. *British Journal of Cancer*, 103(6), 899–909. doi: [10.1038/sj.bjc.6605829](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605829).
- Endah, S. N.. (2018). *Analisa Ekspresi Gen Housekeeping Pada Ikan Gurame (Osphronemus Gouramy) Yang Diberi Pakan Campuran Tepung Spirulina plantesis Dengan Paparan Suhu 20°C*. (Skripsi) : Program Studi Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.
- Fahmi, M.R., & Hirnawati. (2010). Keragaman Ikan Sidat Tropis (*Anguilla sp.*) di Perairan Sungai Cimandiri, Pelabuhan Ratu, Sukabumi. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. 8, 1-8.
- Franzellitti, S., Kiwan, A., Valbonesi, P., & Fabbri, E.. (2015). Selection of Best-Performing Reference Gene Products for Investigating Transcriptional Regulation Across Silvering in The European Eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific RepoRts*, 5(16966), 1-14. doi: [10.1038/srep16966](https://doi.org/10.1038/srep16966).
- Gallagher, S.R. (2017). Quantitation Of DNA And RNA With Absorption And fluorescence Spectroscopy. *Curr. Protoc. Immunol*, 116, A.31.1-A.31.14. doi: [10.1002/Cpim.20](https://doi.org/10.1002/Cpim.20).
- Gomon, M.F. & Bray, D.J.. (2017). *Anguilla bicolor in Fishes of Australia*. [Online]. Diakses dari: <http://fishesofaustralia.net.au/home/species/1424>
- Gulgun, F., Sengor, U., Alakavuk, D.U., & Tosun, S.Y.. (2013). Effect Of Cooking Methods On Proxymate Composition, Fatty Acid Composition, And Cholesterol Content Of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal Aqtuatic product technology*, 22(2), 160- 167. doi: [10.1080/10498850.2011.635839](https://doi.org/10.1080/10498850.2011.635839).
- Hammet,F., Mahmood, K., Green, T.R., Dumont, T.N., Southey, M.C., Buchanan, D.D., ... Park, D.J. (2019). Hi-Plex2: A Simple And Robust Approach To Targeted Sequencing-Based Genetic Screening. *BioTechniques*, 67(3), 118-122. doi: [10.2144/btn-2019-0026](https://doi.org/10.2144/btn-2019-0026).
- Hayashi, R.. (2019). Gene Expression and the Impact of an Antioxidant Supplement in the Cataractous Lens. Dalam Preedy, V.R., & Watson, R.R. (penyunting), *Handbook of Nutrition, Diet, and the Eye (Second Edition)* (hlm. 551-568). London : Academic Press.

- Hendling, M., Pabinger, S., Peters, K., Wolff, N., Conzemius, R., & Barisi, I. (2018). Oli2go: An Automated Multiplex Oligonucleotide Design Tool. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W252-W256. doi: [10.1093/nar/gky319](https://doi.org/10.1093/nar/gky319).
- Hu, Q., Guo, W., Gao, Y., Tang, R., & Li, D.. (2014). Reference Gene Selection for Real-Time RT-PCR Normalization In Rice field Eel (*Monopterus albus*) During Gonad Development. *Fish Physiol Biochem*, 40(6), 1721–1730. doi: [10.1007/s10695-014-9962-3](https://doi.org/10.1007/s10695-014-9962-3).
- Hulley, E.N., Tharmalingam, S., Zarnke, A., & Boreham, D.R. (2019). Development And Validation Of Probe-Based Multiplex Real-Time PCR Assays For The Rapid And Accurate Detection Of Freshwater Fish Species. *PLoS ONE*, 14(1), e0210165. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210165>.
- Imriani, S. (2013). “*The Incredible*”: *Regulasi Molekuler, Housekeeping Genes Vs Stress Inducible Genes*. [Online]. Diakses dari: <http://majalah1000guru.net/2013/07/regulasi-molekuler-gen/>.
- Index to Organism Names (ION). (2020). *Anguilla bicolor*. [Online]. Diakses dari <http://www.organismnames.com/namedetails.htm?lsid=73471>.
- International Union for Conservation of Nature (IUCN). (2019). *Anguilla bicolor*. [Online]. Diakses Dari : <https://www.iucnredlist.org/species/166894/96228348>.
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A.H.. (2014). FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis. *Springer Science*, 1116, 271-302. doi: [10.1007/978-1-62703-764-8_18](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_18).
- Kalendar, R., Tselykh, T.V., Khassenov, B., & Ramanculov, E.M.. (2017). Introduction on Using the FastPCR Software and the Related Java Web Tools for PCR and Oligonucleotide Assembly and Analysis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1620, 33-64. doi:[10.1007/978-1-4939-7060-5_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_2).
- Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP). (2020). *Sidat*. [Online]. Diakses Dari: <https://kkp.go.id/djprl/bpsplpadang/page/323-sidat>.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan (KKP). (2020). *KKP Ajak Masyarakat Kembangkan Potensi Budidaya Sidat Siaran PERS*. [online]. Diakses dari : <https://kkp.go.id/artikel/21418-kkp-ajak-masyarakat-kembangkan-potensi-budidaya-sidat>.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... Zoric, N.. (2006). The Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 95-125. doi: [10.1016/j.mam.2005.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007).
- Kusumawaty, D. (2015). *Pola Distribusi Gen-Gen Virulen Pada Aeromonas hydrophila dan Ekspresi Gen-Gen yang Terlibat Dalam Sistem Imunitas Bawaan Ikan Gurame (Osphronemus gouramy) yang diinjeksi Patogen Paska Pembungkaman dengan ds siRNA MYD88*. (Disertasi). Program Studi Doktor Biologi, Institut Teknologi Bandung, Bandung.

- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C., & Kim, Y.H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Visualized Experiments*, 62, e3923. doi: [10.3791/3923](https://doi.org/10.3791/3923).
- Lepais, O., Chancere, I.E., Boury, C., Salin, F., Manicki, A., Taillebois, L., ... Guichoux, G. (2020). Fast Sequence-Based Micro Satellite Genotyping Development Workflow. *PeerJ*, 8, e9085. doi: <http://doi.org/10.7717/peerj.9085>.
- Lia, Y., Hana, J., Wua, J., Lia, D., Yanga X., Huang, A., ... Dua, X. (2020). Transcriptome-Based Evaluation And Validation Of Suitable Housekeeping Gene For Quantification Real-Time PCR Under Specific experiment Condition In Teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology*, 98, 218–223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.018>.
- Lifetechnologies. (2012). *Real Time PCR Handbook*. [Online]. Diakses dari : <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr>
- Liu, C., Wu, G., Huang, X., Liu, S., & Cong, B. (2012). Validation Of Housekeeping Genes For Gene Expression Studies In An Ice Alga *Chlamydomonas* During Freezing Acclimation. *Extremophiles*, 16(3), 419–425. doi: [10.1007/s00792-012-0441-4](https://doi.org/10.1007/s00792-012-0441-4).
- Livak, K.J., & Schmittge, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. doi: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
- Lui, Y.L., Lin, Z., Lee, J.J., Chow, V.T., Poh, C.L., & Tan, E.L. (2013). Beta-Actin Variant Is Necessary For Enterovirus 71 Replication. *Biochem Biophys Res Commun*, 433(4), 607–10. doi: [10.1016/j.bbrc.2013.03.044](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.044).
- Mahanty, A., Purohit, G.K., Mohanty, S., Nayak, N.R. & Mohanty, B.P. (2017). Suitable Reference Gene For Quantitative Real-Time PCR Analysis Of Gene Expression In Gonadal Tissues Of Minnow *Puntius Sophe* Under High-Temperature Stress. *BMC Genomics*, 18(1), 617. doi: [10.1186/s12864-017-3974-1](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3974-1).
- Mardiani, N.D. (2018). *Analisis Ekspresi Gen Housekeeping Pada Ikan Gurame (Osphronemus gouramy) yang diberi Stres Suhu Rendah 20°C Pasca Pemberian Suplemen Spirulina plantesis*. (Skripsi) : Program Studi Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.
- Mir, I.N., Srivastava, P.P., Bhat, I. A., Muralidhar, A.P., Babu, P.G., Varghese, T., Chanu, T.I., & Jain, K.K. (2018). Reference Gene Selection For Quantitative Real-Time RT-PCR Normalization In *Clarias Magur* At Different Larval Developmental Stages. *Indian Journal of Animal Sciences*, 88(3), 380–382.
- Mitter K. , Kotoulas G., Magoulas A., & Sarropoulou E. (2009). Evaluation Of Housekeeping Genes For Quantitative Expression Studies In The European Seabass *D. labrax*. 9th Symposium on Oceanography & Fisheries, 2009 - Proceedings, Volume II.

- Murtini, S. (2015). *Makanan Alami Dan Perkembangan Anatomi Saluran Pencernaan Ikan Sidat (Anguilla bicolor bicolor McClelland 1844) Dari Muara Sungai Cimandiri Pelabuhan Ratu Jawa Barat*. (Tesis) : Program Studi Pengelolaan Sumberdaya Perairan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nafsiyah, I., Nurilmala, M., & Abdullah, A. (2018). Komposisi Nutrisi Ikan Sidat *Anguilla Bicolor Bicolor* Dan *Anguilla Marmorata*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(3), 504-512.
- Nurhayati, B., & Darmawati, S. (2017). *Biologi Sel Dan Molekuler*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Ong, H.S.. (2019). Comparative Genomics Analysis. *Elsevier. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 3, 425-431. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20126-X>.
- Palumbi, S.R. (1994). Genetic Divergence, Reproductive Isolation, And Marine Speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25, 547-572. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.es.25.110194.002555>.
- Peterson, S.M., & Freeman, J.L. (2009). RNA Isolation from Embryonic Zebrafish and cDNA Synthesis for Gene Expression Analysis. *J. Vis. Exp.*, (30), e1470. doi : [10.3791/1470](https://doi.org/10.3791/1470).
- Pike, C., Crook, V., Gollock, M. & Jacoby, D. (2019). *Anguilla bicolor*. *The IUCN Red List Of Threatened Species* 2019: E.T166894a96228348. doi: <http://dx.doi.org/10.2305/iucn.uk.2019-3.rlts.t166894a96228348.en>
- Premier Biosoft. (2020). *PCR Primer Design Guidelines*. [Online]. Diakses dari http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html.
- Premierbiosoft. (2019). *Real Time PCR*. [Online]. Diakses dari: http://premierbiosoft.com/tech_notes/real_time_PCR.html
- Purohit, G. K., Mahanty, A., Mohanty, B. P., & Mohanty, S. (2016). Evaluation Of Housekeeping Genes As References For Quantitative Real-Time PCR Analysis Of Gene Expression In The Murrel *Channa striatus* Under High-Temperature Stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1), 125–135. doi: <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0123-0>
- Rachmawati, F.N., & Susilo, U.. (2011). Profil Hormon dan Kinerja Reproduksi Ikan Sidat (*Anguilla bicolor* McClelland) yang Tertangkap di Perairan Segara Anakan Cilacap. *Biota*, 16(2), 221–226. doi: <https://doi.org/10.24002/biota.v16i2.103>.
- Rachmawati, F.N., Susilo, U., & Muslih. (2017). Karakteristik reproduksi ikan sidat *Anguilla bicolor* McClelland, 1844 yang diinduksi GNRH-analog. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 17(2), 155-163. doi: <https://doi.org/10.32491/jii.v17i2.355>.

- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X.. (2013). An Improvement Of The $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method For Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3), 71–85.
- Robin. (2012). *Potensi dan Permasalahan Pengembangan Budidaya Ikan Sidat* (hlm. 318). Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Roche Molecular Biochemicals. (2020). *Optimization of Reactions to Reduce Formation of Primer Dimers*. [Online]. Diakses dari: <https://www.genequantification.de/roche-primer-dimer>.
- Sadili, D., Kamal, M., Puslitbangkan, K., Sarmintohadi, Ramli, I., Miasto, Y., ... Terry, N.. (2016). *Konservasi Sidat*. Jakarta: Direktorat Konservasi Dan Keanekaragaman Hayati Laut.
- Sahoo, P.K., Parida, S., Mohapatra, A., & Mohanty, J.. (2019). Selection of Candidate Reference Genes for RT-qPCR Analysis in *Argulus siamensis* and Their Validation Through Screening of Drugs and Drug Targets. *Scientific RepoRtS*, 9, 18365. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54881-w>.
- Sarwono, B. (2011). *Budidaya Belut dan Sidat*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Sasmito, D.E.K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I.. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*, 5, 93-102.
- Seo, J.S., Choi, J.H., Seo, H., Ahn, T.H., Chong, W.S., Kim, S.H., Cho H.S., & Ahn, J.C.. (2013). Copmparison of Major Nutrients in Eels *Anguilla japonica* Cultured With Different Formula Feeds or At Different Farms. *Fish Aquatic Science*, 16, 85-92.
- Setiawan, A.N., & Lokman P.M.. (2010). The Use of Reference Gene Selection Programs to Study The Silvering Transformation in A Freshwater Eel *Anguilla Australis*: A Cautionary Tale. *BMC Molecular Biology*, 11, 75.
- Shoyab, M., & Kant, T.. (2014). Streamlined Extraction Protocol For High Quality Rna From *Prosopis juliflora* And *Salvadora persica* And Its Suitability For Downstream Processing. *J. Phytol. Res.* 27(1-2), 1-5.
- Sinha, P., Singh, V.K., Suryanarayana, V., Krishnamurthy, L., Saxena, R.K., & Varshney, R.K. (2015). Evaluation and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeon pea (*Cajanus cajan*) Under Drought Stress Conditions. *PLOS ONE*, 10(4), e0122847. doi: [10.1371/journal.pone.0122847](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122847).
- Slembrouck, J., Komarudin, O., Maskur, & Legendre, M..(2005). Petunjuk Teknis Pembenuhan Ikan Patin Indonesia, *Pangasius djambal* (hlm. 123-132). Terjemahan oleh Subandi, A., & Khan, Z.. Jakarta: IRD-BRKP.
- Solahuddin, G.. (2019). *Imunomodulator Bukan Vitamin Tapi Obat, Efeknya Keseimbangan Sel Limfosit Bisa Terganggu*. [Online]. Diakses dari :

[https://health.grid.id/read/351632519/imunomodulator-bukan-vitamin-tapi-
obat-efeknya-keseimbangan-sel-limfosit-bisa-terganggu?page=all](https://health.grid.id/read/351632519/imunomodulator-bukan-vitamin-tapi-obat-efeknya-keseimbangan-sel-limfosit-bisa-terganggu?page=all)

- Sugeha, Y.H.. (2011). *Tangkapan Ikan Sidat Mulai Menurun*. [Online]. Diakses dari :<https://internasional.kompas.com/read/2011/06/17/18164196/tangkapan.ikan.sidat.mulai.menurun>.
- Sugianti, Y., Rahmia, M., Putri, A., & Purnamaningtyas, E.S.. (2020). Spesies Ikan Sidat (*Anguilla* Spp.) dan Karakteristik Habitat Ruayanya di Sungai Cikaso, Sukabumi, Jawa Barat. *LIMNOTEK Perairan Darat Tropis di Indonesia*, 27(1), 39–54. doi: <http://dx.doi.org/10.14203/limnotek.v27i1.329>.
- Taillebois, L., Manicki, A., Daverat, F., Nachón, D.J., & Lepais, O.. (2019). Variable outcomes of hybridization between declining *Alosa alosa* and *Alosa fallax*. *Evolutionary Applications*, 13(4), 636-651. doi: [10.1111/eva.12889](https://doi.org/10.1111/eva.12889).
- Tamam, B. (2016). *Real Time PCR*. [Online]. Diakses dari: <https://www.generasibiologi.com/2016/03/real-time-pcr.html>.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M.. (2010). A Practical Approach to RT-Qpcr—Publishing Data That Conform to The MIQE Guidelines. *Methods*, 50(4), S1–S5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>.
- Tesch, F.W. (2003). *The Eel*. Third Edition. Edited by J.A Thorpe (hlm.1-71 & 295-305). London: Blackwell Science.
- ThermoFisher. (2020). *Agarose Gel Electrophoresis of RNA*. [Online]. Diakses Dari:<https://www.thermoFisher.com/id/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/rna-protocol/agarose-gel-electrophoresis-of-rna.html>.
- ThermoFisher. (2020). *PCR Methods*. [Online]. Diakses dari : <https://www.thermoFisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html>.
- Thornton, B., & Basu, C.. (2011). Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 39(2), 145–154. doi: [10.1002/bmb.20461](https://doi.org/10.1002/bmb.20461).
- Trotta, M., Nhuth, S.S., Pepe, T., Cortesi, M.L., Puyet, A., & Bautista, J.A.M.. (2005). Multiplex PCR Method for Use in Real-Time PCR for Identification of Fish Fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and Common Substitute Species. *J. Agric. Food Chem*, 53(6), 2039–2045. doi: [10.1021/jf048542d](https://doi.org/10.1021/jf048542d).
- Uddin, M.S., & Cheng, Q.. (2015). Recent Application of Biotechniques for The Improvement of Mango Research. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*, 195-212. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100068-7.00012-4>

- Wan, Q., Whang, I., Choi, C.Y., Lee, J.S., & Lee, J. (2011). Validation Of Housekeeping Gene As Internal Controls For Studying Biomarkers Of Endocrine-Disrupting Chemicals In Disk Abalone By Real-Time PCR. *Comparative biochemistry and physiology*, 153(3), 259-268. doi: [10.1016/j.cbpc.2010.11.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.11.009).
- Wang, M., Ibarz, L.E., Moody, S., Zeng, N., Clipson, A., Huang, Y., ... Du, M.Q. (2015). Somatic Mutation Screening Using Archival Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Fluidigm Multiplex PCR and Illumina Sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(5), 521-532. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.008>
- Wang, Z., Lyu, Z., Pan, L., Zeng, G., & Randhawa, P.. (2019). Defining Housekeeping Genes Suitable For RNA-Seq Analysis Of The Human Allograft Kidney Biopsy Tissue. *BMC Med Genomics*, 12, 86. doi: <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0538-z>.
- Wijayanti, I., & Setiyorini, E.S.S.. (2018). Nutritional Content of Wild and Cultured Eel (*Anguilla bicolor*) from Southern Coast of Central Java. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 23(1), 37-44. doi: [10.14710/ik.ijms.23.1.37-44](https://doi.org/10.14710/ik.ijms.23.1.37-44).
- William, C., & Shiel, J.R.. (2017). *Definition Of Housekeeping Genes*. [Online]. Diakses dari : <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=24232>
- Woo, L., & Strong, W. (2006). RNA Quantitation: A Comparative Analysis Using The Experion Automated Electrophoresis System, Ribogreen Reagent, And Ultraviolet Spectroscopy. *Bio-Rad Laboratories*. 06-0125.0806.Sig 1205.
- Xia, X., Huo, W., Wan, R., Xia, X., Du, Q., & Chang, Z.. (2017). Identification of Housekeeping Genes As References for Quantitative Real-Time RT-PCR Analysis in *Misgurnus anguillicaudatus*. *Journal of Genetics*, 96, 895–904. doi: <https://doi.org/10.1007/s12041-017-0845-0>
- Yulianti, T.. (2019). *Isolasi dan Identifikasi Housekeeping Gene pada Ikan Sidat (Anguilla bicolor)*. (Skripsi) : Program Studi Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.